Teil 2

Bedienungsanleitung für die Agilent HPLC Anlagen

Bedienungsanleitung für die Agilent - HPLC

Diese kurze Übersicht soll helfen die HPLC-Anlage fehlerfrei zu bedienen. Zuerst wird die Bedienung der einzelnen Arbeitsschritte und Geräte erklärt, am Ende gibt es dann Kurzzusammenfassungen für "aufdrehen", "Lauf starten" und "abdrehen". Es werden hier nicht alle Möglichkeiten der Geräte beschrieben, sondern nur die, die für den üblichen Praktikumsbetrieb relevant sind.
Bitte keine Experimente mit unbekannten Tasten!! Manche Bedienungsfehler sind nur durch ein Geräteservice wieder zu beheben - und das ist sehr teuer!!

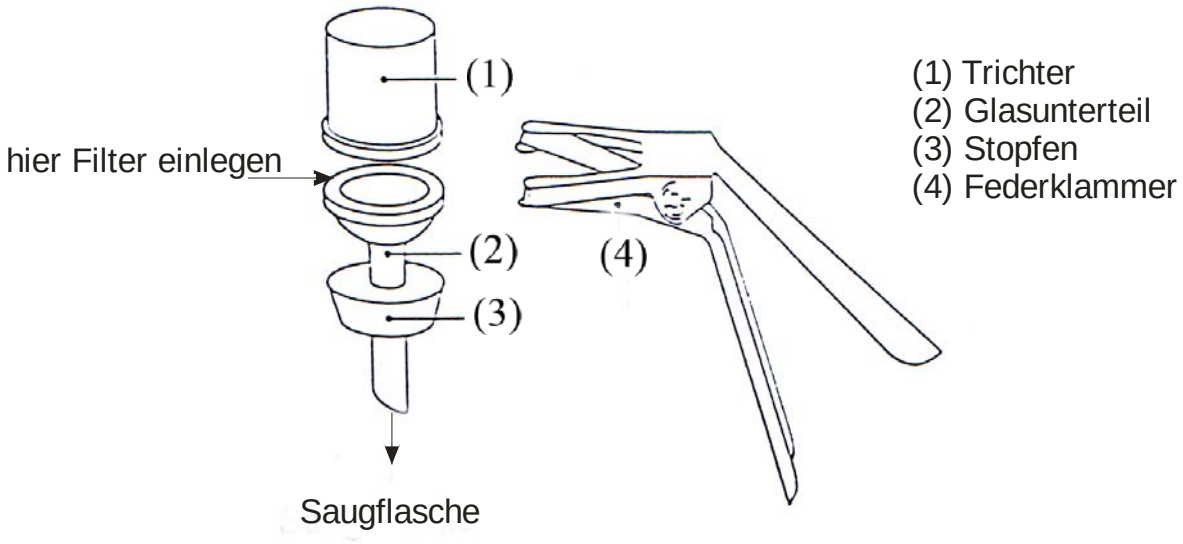
Laufmittelbereitung

Alle Laufmittel müssen partikelfrei (filtriert) und entgast sein.

Vorgangsweise:

1.) Berechnung lt. Angabe
2a.) Im Kühlraum schauen, ob es dieses Laufmittel vielleicht schon gibt. Bitte unbedingt vor der Verwendung warten, bis das Laufmittel Zimmertemperatur hat! Wenn nicht, oder nicht genug Laufmittel da ist, weiter bei 2b.
2b.) Herstellung des wässrigen Laufmittels:

* Einwaage des Salzes (bei Acetat-Puffern der Essigsäure) in Becherglas
* (Bei flüssigen Reagenzien: Wasser vorlegen, DANN Säuren zugeben!)
* in RO-Wasser lösen (nur ca. 3/4 der endgültigen Wassermenge zugeben)
* Magnetkern zugeben
* pH-Wert einstellen (rühren!)
* Lösung in eine Mensur überführen und bis zum gewünschten Volumen auffüllen
* Filtrationsapparatur zusammenbauen, Filter einlegen (Filter = weiß, Zwischenblatt = blau); filtrieren durch Anlegen eines Unterdrucks;
  Vakuumschlauch der Pumpe kann einfach in den Auslass der Saugflasche gesteckt werden. Kein Schliffzwischenstück nötig.



* Befeuchten des Filters und Ausspülen der Saugflasche: ca. 20 - 50 ml in den Trichter füllen, Pumpe anschließen und filtrieren, Vakuumschlauch entfernen, vorsichtig Saugflasche schwenken, ausleeren
* Portionsweise das gesamte Laufmittel filtrieren
* In saubere trockene Vorratsflasche überführen
* Beschriften : Art des Puffers, Konzentration, Name des Herstellers, Datum
* Flasche auf die HPLC stellen, Laufmittelschlauch „A“ bzw. „A1“ ´rein

3.) Herstellung eines Laufmittels mit organischem Anteil (nur Lösungsmittel verwenden, die speziell für das HPLC-Beispiel bereitgestellt werden, da nur sie den hohen Anforderungen entsprechen)

* Wässriger Teil muss wie oben vorbereitet werden (filtrieren), dann:
* Gewünschte Menge in der Mensur abmessen und in Vorratsflasche geben
* Organischen Anteil (Methanol bzw. Acetonitril) in Mensur abmessen und ebenfalls in die Vorratsflasche füllen. (ACHTUNG ! Nach dem Vereinigen darf nicht mehr filtriert werden, da die Filter nicht lösungsmittelresistent sind! Die organischen Lösungsmittel sind schon vom Hersteller vorfiltriert.)
* Flasche auf die HPLC stellen, Laufmittelschlauch „B" bzw. „B1“ ´rein

4.) Ein kurzes Beispiel:

Laufmittel A: 0.1 M NaAc pH = 4.0 (500 ml)
Laufmittel B: 30 % MeOH in Wasser (300 ml)

1.) 3g Essigsäure einwiegen (MW = 60) in ca. 300 ml Wasser geben, mit verdünnter NaOH auf pH = 4.0 einstellen, in Mensur überführen, auffüllen auf 500 ml, filtrieren, aufstellen;
2.) 250 ml RO-Wasser (Messraum) filtrieren, davon 200 ml (500 ml-Mensur) in Vorratsflasche füllen, 100 ml (100ml-Mensur) Methanol zugeben, aufstellen;

Probenvorbereitung

Die Probe muss partikelfrei sein.

Probenvorbereitung laut Vorschrift zum Beispiel.
Vor dem unmittelbaren Auftragen auf die HPLC **MUSS** zentrifugiert werden:

In Eppendorfhütchen 3 Minuten mit 8000 rpm zentrifugieren. Längeres Zentrifugieren kann empfindliche Bestandteile (z.B. Vitamine) beeinträchtigen, da die Zentrifuge nicht kühlt!
Nicht vergessen: genau gegenüber muss auch ein Hütchen in den Rotor. Genaues Austarieren der Volumina ist nicht erforderlich.

Zentrifuge: (Gegenüber der HPLC)

Power-Schalter auf der Rückseite des Geräts.

Kurzlauftaste -
solange der Knopf gedrückt ist, läuft der Rotor

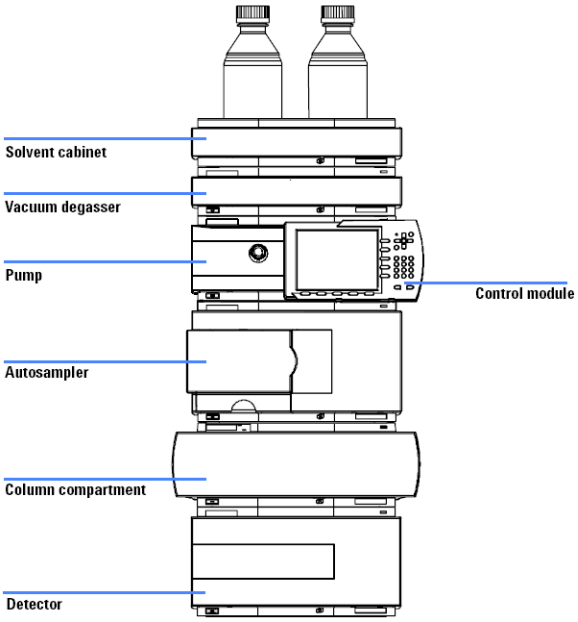
Deckel auf

Start (Geschwindigkeit und Zeit vorher einstellen !)

Not-Aus (wenn möglich vermeiden)

Den Überstand gleich auf die HPLC auftragen.
Aufpassen, dass beim Aufziehen in die Spritze kein Pellet mitgeht.

TECHNIK



Agilent Technologies –Serie 1200 Benutzerhandbuch

Eine Anlage besteht aus :

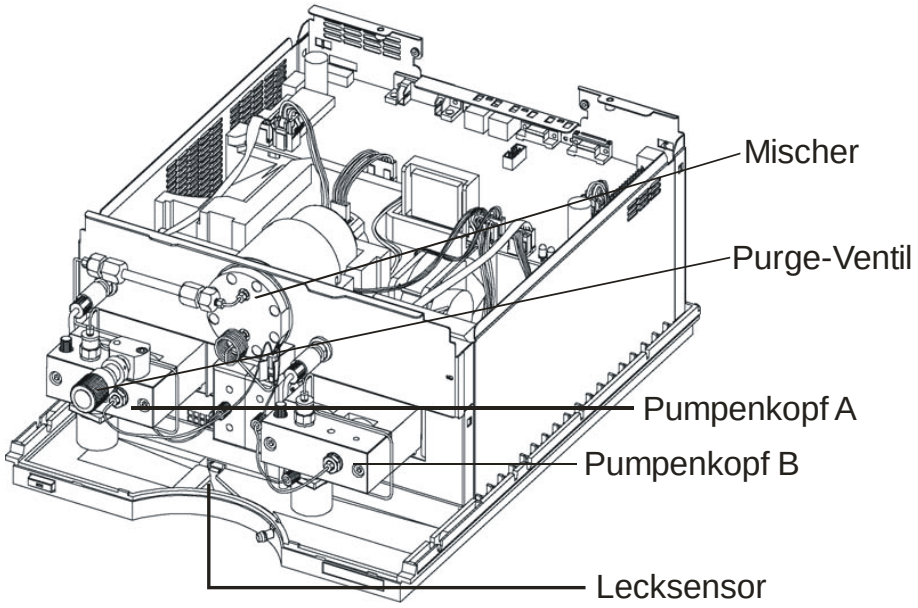
- Laufmittel
- Pumpe + Ventil, das die Laufmittelkonzentrationen steuert
- Mischzone
- Injektor / Automatischer Probengeber
- Säule (ev. Säulenofen)
- Detektor (Photometer / Refraktometer / Fluorimeter)
- Fraktionskollektor
- Computer

SIE müssen sich um die Herstellung des Laufmittels, die richtigen Einstellungen der Pumpe, des jeweiligen Detektors und des Computers kümmern.
WIR schrauben an der Anlage herum. Sowohl bei der Elektronik als auch Säulenwechsel wenn nötig...

.....es wird schon klappen !!!!! .....

Pumpe

So sieht sie aus:



Agilent Technologies –Serie 1200 Benutzerhandbuch

Eingeschalten: Die Pumpe wird automatisch mit der Steckerleiste eingeschaltet.

"Purge"-Ventil: offen (180° nach links drehen): Laufmittel geht direkt nach der Pumpe in den Abfall;
geschlossen: Laufmittel geht über die Säule

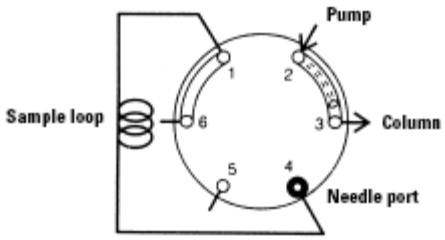
Das Einstellen der Parameter und die Kontrolle der Pumpe erfolgt über die Software am Computer.

Entgaser

Bei dem Entgaser handelt es sich um einen Vakuumentgaser, der Ihnen das Begasen der Laufmittel mit Helium erspart. Sie müssen an dem Gerät nichts einstellen, nur immer bedenken, dass dieses aufgrund der engen Kapillaren ganz besonders zum Veralgen neigt und deshalb die korrekte Lagerung der Anlage (in verdünnter alkoholischer Lösung) extrem wichtig ist.

Manueller Injektor

Die Aufgabe der Probe erfolgt NACH der Pumpe, also hochdruckseitig.
In der „Load“-Position liegt die Probenschleife nicht im Lösungsmittelstrom (Abb. A). Sie ist somit drucklos und man kann sie mittels einer Spritze mit Probe befüllen. Das andere Ende der Schleife geht jetzt in den Abfluss. In der "Inject"-Position ist die Schleife in die Leitung zwischen Pumpe und Säule integriert (Abb. B). Die Probe wird somit als schmale Zone auf den Säulenkopf gepumpt. Beim Umlegen des Hebels wird der Weg zwischen Pumpe und Säule unterbrochen, sodass sich sehr rasch Druck aufbaut. **Das Umschalten muss daher zügig vor sich gehen.**



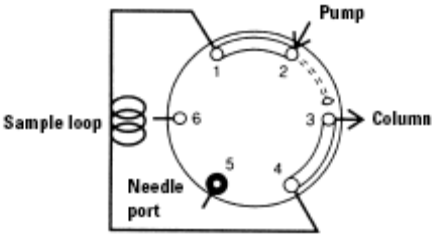


Abb. A „Load“ Position Abb. B “Inject” Position

Agilent Technologies –Serie 1200 Benutzerhandbuch

Nach dem Starten des Laufs nach ca. 1 Minute den Hebel wieder zurück in die Load-Position stellen, da der Computer sonst kontinuierlich ein Startsignal bekommt.

Detektoren

A.) Fluorimeter

Die Fluorimeter werden automatisch mit der Steckerleiste eingeschaltet (HPLC 1 und HPLC 3). Wir verwenden eine Xenon-Flash-Lampe, diese benötigt keine Vorwärmzeit.
Bitte rekapitulieren Sie das Prinzip der Fluoreszenz !
Das Einstellen der Wellenlängen (Ex/Em) und die Kontrolle des Fluorimeters erfolgt über die Software am Computer.

B.) Photometer

Die Photometer werden automatisch mit der Steckerleiste eingeschaltet. Jedes der vorhandenen Photometer hat unterschiedliche Fähigkeiten:

HPLC 1: Multi Wavelength-Detector
HPLC 2: Single Wavelength-Detector
HPLC 3: Diodenarray-Detector,

die Sie aber im Rahmen der Übungen nicht voll ausschöpfen werden. Bitte rekapitulieren Sie was Sie über die verschiedenen Wellenlängenbereiche wissen (In welchem Bereich ist UV? Wo ist sichtbares Licht? Was ist darüber, was darunter?).

Die Lampe braucht eine Aufwärmzeit von ca. 10 Minuten bis sie stabil ist.
Das Einstellen der Wellenlänge(n) und die Kontrolle des Photometers erfolgt über die Software am Computer.

C.) Refraktometer

Das Refraktometer (HPLC 2) wird automatisch mit der Steckerleiste eingeschaltet. Im Gerät gibt es eine Messzelle durch die kontinuierlich Laufmittel beziehungsweise Probe fließt, und eine Referenzzelle, die zu Beginn der Arbeiten mit der Referenzlösung – normalerweise das Laufmittel OHNE Probe – befüllt ist. Bitte achten Sie darauf, dass die Referenzzelle immer das richtige Laufmittel enthält!
Bei der Verwendung des Refraktometers sind Gradienten nur sehr eingeschränkt möglich.
Das „Waste“-Gefäß darf nach dem Refraktometer nicht zu tief (am Boden) stehen, sondern muss auf gleiche Höhe (Tisch) gebracht werden, sonst kommt es zu unerwünschten Sog-Effekten.
Das Refraktometer hat einen integrierten Ofen um die Temperatur konstant zu halten. Es dauert ca. eine Stunde um auf 60°-70°C aufzuheizen.
Die Einstellung und Steuerung erfolgt wie bei allen anderen Geräten über die Software am Computer.

Software (Einstellungen und Starten)

Diese Kurzanleitung wir der Software nicht gerecht! Natürlich gibt es viele, viele weitere Einstellungen und Möglichkeiten. Hier werden nur die einfachsten Schritte zum Starten und Bedienen beschrieben.

Wenn Sie Daten generieren wollen: **ZUERST Steckdosenleiste der Anlage** einschalten, kurz warten bis alle Lampen an den Geräten (jeweils links unten) auf grün sind, **DANN erst den Computer** einschalten.
(Die Tür von den Fraktionssammlern muss korrekt geschlossen sein, sonst geht es nicht weiter !)

HPLC-Läufe durchführen:

Mit Doppelklick den „on-line“ Modus wählen. Sie erhalten folgendes Bild:

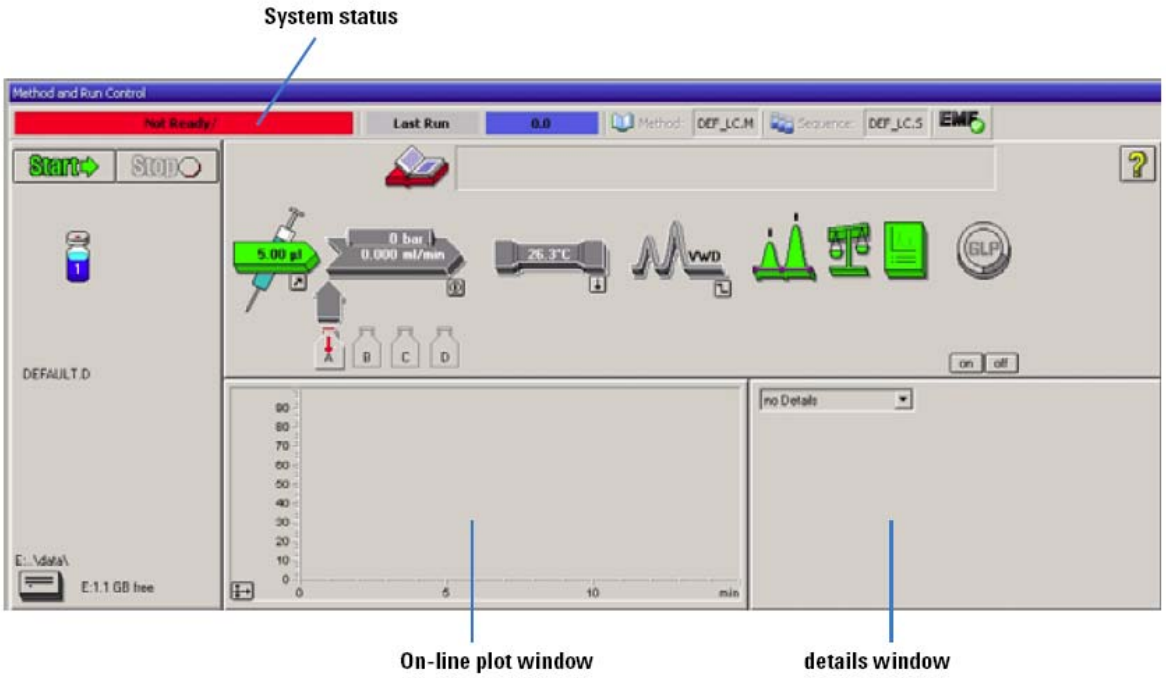


Figure 10 Initial ChemStation screen (Method and Run Control)

Agilent Technologies –Serie 1200 Benutzerhandbuch

Einige der Komponenten sind grau hinterlegt - das heißt nicht im on-Modus - und links oben ist der Balken rot und es steht „not ready“. Ihre Aufgabe ist es nun, die Parameter der Komponenten einzugeben und danach das jeweilige Gerät einzeln einzuschalten. Sobald das Gerät arbeitsbereit ist, ist der jeweilige Abschnitt grün. Sobald alle Komponenten grün sind, wird auch der Balken links oben grün und schaltet auf „ready“ (siehe unten). Erst dann kann es mit den Läufen los gehen !

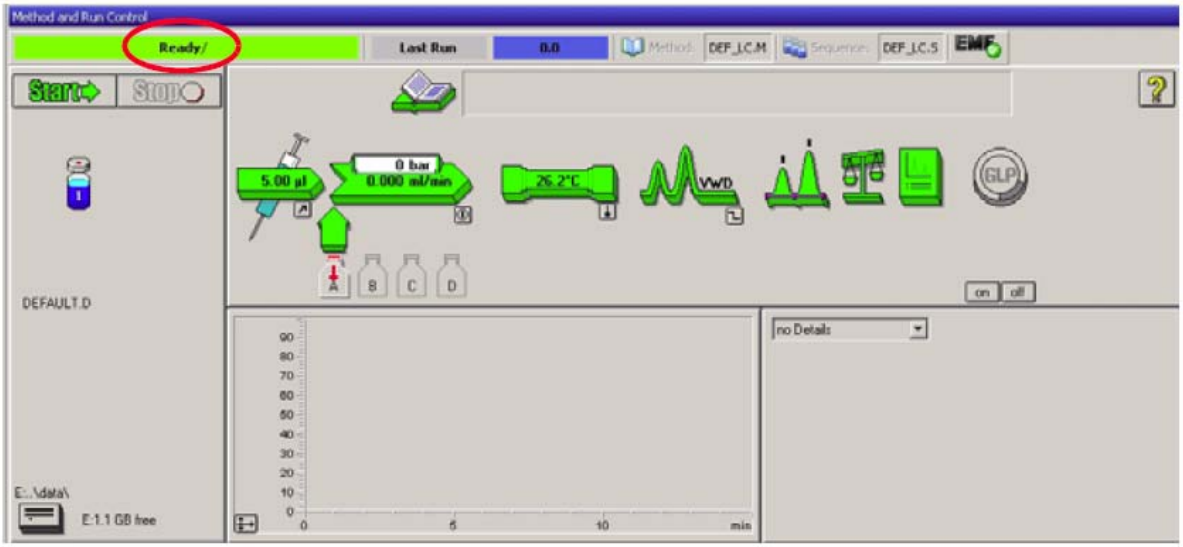


Figure 11 Turning on the HPLC Module

Agilent Technologies –Serie 1200 Benutzerhandbuch

Pumpe anklicken:

>> Set up pump
> Flow rate eingeben
> Startbedingungen (% Laufmittel) eingeben
> Gradient eingeben
> Stop time eingeben

>> Control
> Pumpe auf „on“
> „Periodic seal wash“ auf „2 min every 30 min“ stellen

Detektor anklicken:

>> Set up VWD (variable wavelength detector)/FLD (Fluoreszenzdetektor)
> Wellenlänge(n) eingeben

>> Control
> Detektor auf „on“

PURGEN:

Wenn Sie das Gerät übernehmen, ist es in verdünnter alkoholischer Lösung (30% Methanol in Wasser) gelagert. Sobald Sie Ihre benötigten Laufmittel angeschlossen haben, wird das Aufbewahrungsreagens durch ein kurzes Programm mit einer hohen Flussrate (meist 5 ml/min) aus den Schläuchen und der Pumpe gespült (NICHT aus der Säule). Zu diesem Zweck öffnet man an der Pumpe das Purge-Ventil (ca. 180°-Drehung) und startet das Purge-Pumpenprogramm. Spülen der Säule siehe nächster Absatz.

Pumpe anklicken
Pumpe soll auf „off“ sein
Purgeventil am Gerät öffnen
Programmauswahl: PURGE.M
Programm kontrollieren
Pumpe auf „on“ schalten

Sobald der Vorgang abgeschlossen ist:

Pumpe auf „off“
Programm mit niedrigerer Flussrate wählen
Purge-Ventil am Gerät wieder schließen.

Wenn Sie vergessen das Purge-Ventil an der Pumpe nach dem Purgen zu schließen, geht der gesamte Laufmittelstrom direkt in den Abfall und nicht über die Säule. (Erkennt man daran, dass sich kein Druck aufbaut.)
Falls Sie Ihr Laufmittel über Nacht im Gerät belassen durften, sollte trotzdem am nächsten Tag der Purge-Vorgang durchgeführt werden um das alte Laufmittel aus dem Gerät zu entfernen (es könnten sich Luftblasen gebildet haben).

SÄULE SPÜLEN:
Zum Spülen der Säule muss nach dem Purgen extra ein kurzes Programm mit niedrigerer Flussrate (ca. 0,8 ml/min) durchgeführt werden. Für das Verhältnis zwischen Laufmittel A und B verwenden Sie die Startbedingungen Ihres späteren Laufs (z.B. Anthranilzucker startet mit 95% A und 5% B) und spülen Sie ca. 10 Minuten. Überlegen Sie, woran Sie erkennen können, ob das 30%ige Methanol schon vollständig aus der Säule entfernt ist.

LAUF STARTEN:
(Der erste Lauf des Tages muss immer ein Leerlauf sein, das heißt: es wird Wasser anstatt der Probe injiziert.)

> Run control
> Sample Info
Ordner angeben, wohin der Lauf gespeichert werden soll
Name angeben, muss immer mit „ .D “ enden
> Run method ..... es erscheint „Waiting for Trigger“

> Probeschleife mindestens 3x mit Wasser spülen;
> Probe injizieren (Spritze stecken lassen)
> Injektorventil umlegen (das ist der Trigger!), nun startet der Lauf
> Nach ca. 1 Minute Injektor wieder in Load-Position und Spritze aus dem Injektor entfernen und reinigen.

ANSICHT:
> View
> Online signals
> Signals window 1

Auswertung von HPLC Läufen:

Zur Datenauswertung kann der Computer auch unabhängig vom Einschalten der Anlage im „off-line“ Modus betrieben werden.

> Data Analysis (links unten)
Links erscheinen die Ordner, dann Single runs, jeweiligen Lauf anklicken;

Nun können Sie die Integrationsparameter so verändern, dass alle wichtigen Peaks beschriftet werden, alle anderen aber nicht.

Ausdruck:
Bitte NUR das Chromatogramm Ihrer Probe ausdrucken. Die Standardläufe und Quantifizierungen sollen nicht ausgedruckt werden. Diese Daten sollen im Protokoll in einer Tabelle aufgelistet sein !

> File

Printer setup, specific printer: PDF complete
Print preview, report, print

Arbeitsschritte zu Beginn der Arbeit - AUFDREHEN

Guten Morgen !!!!

1. Herstellung der Laufmittel (einwiegen, filtrieren)
2. Schlauch A(1) in Laufmittel A, Schlauch B(1) in Laufmittel B
3. Steckdosenleiste hinter der HPLC aufdrehen, warten bis bei allen Geräten die grünen Lampen leuchten
4. Computer einschalten, auf „on-line“ Modus gehen
5. Purge-Ventil öffnen (180° nach links),
6. Purgen starten
7. Purge-Ventil schließen
8. Säule spülen: Aufbewahrungsreagens (30% Methanol in Wasser) mit Startbedingungen bei einer Flussrate von 0.8 ml/min herausspülen (ca. 10 min).
9. Leerlauf starten (am Computer Name wählen, Start, Wasser injizieren, Trigger umlegen)
10. Nach ca. 1 Minute Injektorhebel wieder in Ausgangsstellung bringen.
11. Gleich danach: Injektionsnadel aus dem Injektor entfernen und gut spülen

Start einzelner Läufe

Schritte 9. - 11. wiederholen, anstatt Wasser die zentrifugierte Probe injizieren.

Arbeitsschritte am Ende der Arbeit - ABDREHEN

12. Probenschleife 2-3 mal mit dest. Wasser spülen, Schutzspitze hineinstecken,
13. Pumpe auf „off“ stellen
14. Beide Laufmittelschläuche in Aufbewahrungslaufmittel (für die meisten Säulen 30 % Methanol in Wasser) stecken
15. Purge-Ventil öffnen (180° nach links),
16. Purgen starten
17. Purge-Ventil schließen
18. Säule spülen: Das Laufmittel muss durch 30% Methanol in Wasser ersetzt werden (Flussrate 0,8 ml/min ca. 20 Minuten)
19. Den Inhalt der Abfallflaschen in den entsprechenden Entsorgungskanister leeren.
25. Standards und jene Proben, die Sie noch brauchen im Tiefkühlfach (HPLC) lagern,
26. Tisch zusammenräumen !

Schönen Abend !!!